

明細書

発明の名称

顕微鏡

発明の背景

発明の属する技術分野

【0001】

本発明は、顕微鏡、特に染色した試料を機能性の高いレーザ光源からの複数の波長の光により照明して、高い空間分解能を得る高性能かつ高機能の新しい光学顕微鏡に関するものである。

関連技術の説明

【0002】

光学顕微鏡の技術は古く、種々のタイプの顕微鏡が開発されてきた。また、近年では、レーザ技術および電子画像技術をはじめとする周辺技術の進歩により、更に高機能の顕微鏡システムが開発されている。

【0003】

このような背景の中、複数波長の光で試料を照明することにより発する二重共鳴吸収過程を用いて、得られる画像のコントラストの制御のみならず化学分析も可能にした高機能な顕微鏡が提案されている（例えば、特開平 8-184,552 号公報参照）。

【0004】

この顕微鏡は、二重共鳴吸収を用いて特定の分子を選択して、特定の光学遷移に起因する吸収および蛍光を観測するものである。この原理について、図 1 1 ～ 図 1 4 を参照して説明する。図 1 1 は、試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示すもので、先ず、図 1 1 に示す基底状態（S 0 状態）の分子がもつ価電子軌道の電子を波長 λ_1 の光により励起して、図 1 2 に示す第 1 電子励起状態（S 1 状態）とする。次に、別の波長 λ_2 の光により同様に励起して、図 1 3 に示す第 2 電子励起状態（S 2 状態）とする。この励起状態により、分子は蛍光あるいは燐光を発光して、図 1 4 に示すように基底状態に戻る。

【0005】

二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、図 1 2 の吸収過程や図 1 4 の蛍光や燐光の発光を用いて、吸収像や発光像を観察する。この顕微鏡法では、最初にレーザ光等により共鳴波長 λ_1 の光で図 1 2 のように試料を構成する分子を S 1 状態に励起させるが、この際、単位体積内での S 1 状態の分子数は、照射する光の強度が増加するに従って増加する。

【 0 0 0 6 】

ここで、線吸収係数は、分子一個当りの吸収断面積と単位体積当たりの分子数との積で与えられるので、図 1 3 のような励起過程においては、続いて照射する共鳴波長 λ_2 に対する線吸収係数は、最初に照射した波長 λ_1 の光の強度に依存することになる。すなわち、波長 λ_2 に対する線吸収係数は、波長 λ_1 の光の強度で制御できることになる。このことは、波長 λ_1 および波長 λ_2 の 2 波長の光で試料を照射し、波長 λ_2 による透過像を撮影すれば、透過像のコントラストは波長 λ_1 の光で完全に制御できることを示している。

【 0 0 0 7 】

また、図 1 3 の励起状態での蛍光または燐光による脱励起過程が可能である場合には、その発光強度は S 1 状態にある分子数に比例する。したがって、蛍光顕微鏡として利用する場合にも画像コントラストの制御が可能となる。

【 0 0 0 8 】

さらに、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、上記の画像コントラストの制御のみならず、化学分析も可能にする。すなわち、図 1 1 に示される最外殻価電子軌道は、各々の分子に固有なエネルギー準位を持つので、波長 λ_1 は分子によって異なることになり、同時に波長 λ_2 も分子固有のものとなる。

【 0 0 0 9 】

ここで、従来の単一波長で照明する場合でも、ある程度特定の分子の吸収像あるいは蛍光像を観察することが可能であるが、一般にはいくつかの分子における吸収帯の波長領域は重複するので、試料の化学組成の正確な同定までは不可能である。

【 0 0 1 0 】

これに対し、二重共鳴吸収過程を用いた顕微鏡法では、波長 λ_1 および波長 λ_2

2の2波長により吸収あるいは発光する分子を限定するので、従来法よりも正確な試料の化学組成の同定が可能となる。また、価電子を励起する場合、分子軸に対して特定の電場ベクトルをもつ光のみが強く吸収されるので、波長 λ_1 および波長 λ_2 の偏光方向を決めて吸収または蛍光像を撮影すれば、同じ分子でも配向方向の同定まで可能となる。

【0011】

また、最近では、二重共鳴吸収過程を用いて回折限界を越える高い空間分解能をもつ蛍光顕微鏡も提案されている（例えば、特開平9-100,102号公報参照）。

【0012】

図15は、分子における二重共鳴吸収過程の概念図で、基底状態 S_0 の分子が、波長 λ_1 の光で第1電子励起状態である S_1 に励起され、更に波長 λ_2 の光で第2電子励起状態である S_2 に励起されている様子を示している。なお、図15はある種の分子の S_2 からの蛍光が極めて弱いことを示している。

【0013】

図15に示すような光学的性質を持つ分子の場合には、極めて興味深い現象が起きる。図16は、図15と同じく二重共鳴吸収過程の概念図で、横軸のX軸は空間的距離の広がりを表わし、波長 λ_2 の光を照射した空間領域 A_1 と波長 λ_2 の光が照射されない空間領域 A_0 とを示している。

【0014】

図16において、空間領域 A_0 では波長 λ_1 の光の励起により S_1 状態の分子が多数生成され、その際に空間領域 A_0 からは波長 λ_3 で発光する蛍光が見られる。しかし、空間領域 A_1 では、波長 λ_2 の光を照射したため、 S_1 状態の分子のほとんどが即座に高位の S_2 状態に励起されて、 S_1 状態の分子は存在しなくなる。このような現象は、幾つかの分子により確認されている。これにより、空間領域 A_1 では、波長 λ_3 の蛍光は完全になくなり、しかも S_2 状態からの蛍光はもともとないので、空間領域 A_1 では完全に蛍光自体が抑制され（蛍光抑制効果）、空間領域 A_0 からのみ蛍光が発することになる。

【0015】

このことは、顕微鏡の応用分野から考察すると、極めて重要な意味を持っている

る。すなわち、従来の走査型レーザ顕微鏡等では、レーザ光を集光レンズによりマイクロビームに集光して観察試料上を走査するが、その際のマイクロビームのサイズは、集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界となり、原理的にそれ以上の空間分解能は期待できない。

【0016】

ところが、図16の場合には、波長 λ_1 と波長 λ_2 との2種類の光を空間的に上手く重ね合わせて、波長 λ_2 の光の照射により蛍光領域を抑制することで、例えば波長 λ_1 の光の照射領域に着目すると、蛍光領域を集光レンズの開口数と波長とで決まる回折限界よりも狭くでき、実質的に空間分解能を向上させることが可能となる。したがって、この原理を利用することで、回折限界を越える二重共鳴吸収過程を用いた超解像顕微鏡、例えば蛍光顕微鏡を実現することが可能となる。

【0017】

さらに、波長 λ_1 と波長 λ_2 との2つの光の照射タイミングを工夫することで、S/Nを改善でき、かつ蛍光抑制を効果的に起す条件も提案されており、これにより超解像性をより効果的に発現することも可能である（例えば、特開平11-95,120号公報参照）。

【0018】

このような超解像顕微鏡法の具体例として、蛍光ラベラー分子をS0状態からS1状態へ励起する波長 λ_1 の光（特にレーザ光）をポンプ光とし、S1状態からS2状態へ励起する波長 λ_2 の光をイレース光として、図17に示すように、光源81からポンプ光を、光源82からイレース光をそれぞれ放射させ、ポンプ光はダイクロイックミラー83で反射させた後、集光光学系84により試料85上に集光させ、イレース光は位相板86で中空ビーム化した後、ダイクロイックミラー83を透過させてポンプ光と空間的に重ね合わせて集光光学系84により試料85上に集光させるようにしたものが提案されている（例えば、特開平9-272,340号公報参照）。

【0019】

この顕微鏡によると、イレース光の強度がゼロとなる光軸近傍以外の蛍光は抑

制されるので、結果的にポンプ光の広がりより狭い領域 ($\Delta < 0.61 \cdot \lambda / NA$ 、 NA は集光光学系84の開口数) に存在する蛍光ラベラー分子のみが観察されることになり、結果的に超解像性が発現することになる。

【0020】

なお、イレース光を中空ビーム化する位相板86は、例えば、図18に示すように、光軸に対して点対称な位置で位相差 π を与えるように構成したものや、液晶面を用いた光空間変調器、あるいはミラー自身の形状を波長オーダーで制御するデフォーダブルミラーを用いることができる。

【0021】

ところが、本発明者らによる種々の実験検討によると、従来提案されている超解像蛍光顕微鏡にあっては、以下に説明するような改良すべき点があることが判明した。

【0022】

以下、超解像蛍光顕微鏡を図19に示すように構成した場合を例にとって説明する。図19に示す超解像蛍光顕微鏡は、上記の特許文献2に開示されているもので、ローダミン6Gで染色された試料100を観察するものである。この顕微鏡では、モードロック型のNd:YAGレーザ101から出射される波長1064nmのレーザ光をベータ硼酸バリウム(BBO)結晶からなる波長変換素子102により2倍高調波の波長532nmのレーザ光に波長変換し、このレーザ光をハーフミラー103で透過光と反射光との二光路に分岐して、その透過光をポンプ光としてダイクロイックミラー104および105を順次透過させた後、対物レンズ106により二次元移動ステージ107上に載置された試料100に集光させるようにしている。

【0023】

また、ハーフミラー103での反射光は、反射ミラー108で反射させた後、Ba(NO₃)₂結晶からなるラマンシフタ109で波長599nmのレーザ光に波長変換し、このレーザ光をイレース光として反射ミラー110で反射させた後、位相板111により中空ビームに整形し、さらにダイクロイックミラー104によりポンプ光と同軸上に揃えて、ダイクロイックミラー105を経て対物レンズ

106により試料100に集光させるようにしている。

【0024】

一方、試料100からの蛍光は、対物レンズ106を経てダイクロイックミラー105で反射させた後、蛍光集光レンズ112、シャープカットフィルタ113およびピンホール114を経てフォトマル115で受光するようになっている。なお、試料100に投射されるポンプ光およびイレース光は、フォトマル116で受光され、その出力に基づいてNd:YAGレーザ101から出射されるレーザ光の強度が一定となるようにフィードバック制御されるようになっている。

【0025】

このような構成の超解像蛍光顕微鏡においては、イレース光のビーム形状によって超解像性の発現精度が大きく影響される。すなわち、理想的な中空ビームが形成されないと、逆に空間分解能が低下したり、蛍光信号が低下してS/Nが低下したりすることが懸念される。

【0026】

ここで、整形による中空ビームの形状精度は、位相変調技術すなわち波面制御技術の精度に依存する。例えば、イレース光の波面が何らかの原因で乱れると、中空ビームの形状が崩れ、光軸中央部で電場強度の相殺が不完全となって電場強度が残存することになる。このため、この状態でポンプ光とイレース光とを重ね合わせて試料に集光すると、光軸中央部でも蛍光強度が抑制されて、空間分解能が低下するのみならず、S/Nが低下することになる。

【0027】

この波面の乱れの原因となるものは、種々考えられるが、例えば、レーザ光自身の波面の歪み、レーザ光が通過する各光学素子の形状精度の誤差やアライメントの誤差等がある。

発明の概要

【0028】

したがって、かかる点に鑑みてなされた本発明の目的は、特にイレース光に対して上記原因による波面の乱れを除去して完全な中空形状をもつビームに整形でき、これにより極限に近い超解像性を誘起して空間分解能を向上できる顕微鏡を

提供することにある。

【0029】

上記の目的を達成するために、本発明顕微鏡は、少なくとも基底状態を含む3つの電子状態を有する分子を含む試料に対して、上記分子を基底状態から第1電子励起状態に励起するための第1の光、または上記分子を上記第1電子励起状態から、エネルギー準位のより高い第2電子励起状態に励起するための第2の光を所定のビーム形状に空間位相変調する手段と、これら第1の光および第2の光を一部分重ね合わせて集光する手段と、上記試料からの発光を検出する手段と、上記第1の光の光路中および／または上記第2の光の光路中に波面補償手段とを具備し、

該波面補償手段により上記第1の光および／または上記第2の光に生じる波面収差を除去する手段とを具備するようにしたことを特徴とする。

【0030】

また、本発明は、上述した顕微鏡において、上記波面補償手段は、光空間変調器を有することを特徴とするものである。

【0031】

更に、本発明は、上述した顕微鏡において、上記第1の光および／または上記第2の光の空間位相分布を計測する空間位相分布計測手段を設け、該空間位相分布計測手段で計測した空間位相分布に基づいて上記光空間変調器により上記第1の光および／または上記第2の光を空間変調するよう構成したことを特徴とするものである。

【0032】

本発明は、上述した顕微鏡において、上記空間位相分布計測手段で計測した空間位相分布に基づいて波面補償データを生成して、上記光空間変調器による上記第1の光および／または上記第2の光の空間変調をフィードバック制御する制御手段を設けたことを特徴とするものである。

【0033】

また、本発明は、上述した顕微鏡において、上記光空間変調器により、上記第1の光または第2の光を上記所定のビーム形状に空間位相変調するよう構成した

ことを特徴とするものである。

【0034】

先ず、本発明の原理について説明する。本発明では、顕微鏡の光源光学系で発生する波面収差による波面の乱れを波面補償法により除去して上記課題を解決する。このため、本発明の好適一実施の形態では、波面補償手段として、波面を補償制御できる光空間変調器を導入する。この光空間変調器は、回折面の各点への入射光に対して人為的に位相差を与えて入射光を光空間変調するための光学機器で、顕微鏡の光学系で発生する波面の乱れを計測し、そのデータをもとに光空間変調器で波面補償することにより、超解像顕微鏡の分解能を極限まで高めることが可能となる。

【0035】

このような光空間変調器としては、波面制御の観点から位相制御型光空間変調器を用いるのが好ましい。その一例として、複屈折制御型の液晶を有し、この液晶に印加する電圧を制御することにより液晶の傾き状態を変化させて屈折率を変化させ、これにより入射した光の位相を2次元的に制御して波面を補正するようにした複屈折制御型（ECBモード）のものを用いることができる（例えば、特開平6-51340号公報参照）。

斯様に、本発明によれば、特に超解像顕微鏡において、イレース光を波面の乱のない完全な中空形状にビーム整形でき、これにより極限に近い超解像性を誘起して空間分解能を向上させることができる。

図面の簡単な説明

図1は本発明に係る顕微鏡で用いる光空間光変調器の一例の概略構成を示す断面図である。

図2は図1に示す光空間変調器を有する光空間変調装置の構成を示す図である。

図3は図2に示す光空間変調装置の使用態様を説明するための図である。

図4は図3に示す構成での波面補償原理を説明するための図である。

図5は本発明の第1実施の形態を示す超解像顕微鏡の概略構成図である。

図6は同じく、第2実施の形態を示す超解像顕微鏡の概略構成図である。

図7は図6に示す構成において、イレース光を中空ビーム化する際の光空間変

調装置における書き込み光の空間強度分布を示す図である。

図 8 は図 6 に示す構成において、光空間変調装置によりイレース光の中空ビーム化のみを行った場合のイレース光の集光ビーム形状および光強度分布を拡大して示す図である。

図 9 は第 2 実施の形態による光空間変調装置での書き込み光の空間強度分布を説明するための図である。

図 10 は第 2 実施の形態でのイレース光の集光ビーム形状および光強度分布を拡大して示す図である。

図 11 は試料を構成する分子の価電子軌道の電子構造を示す概念図である。

図 12 は図 11 の分子の第 1 励起状態を示す概念図である。

図 13 は同じく、第 2 励起状態を示す概念図である。

図 14 は同じく、第 2 励起状態から基底状態に戻る状態を示す概念図である。

図 15 は分子における二重共鳴吸収過程を説明するための概念図である。

図 16 は同じく、二重共鳴吸収過程を説明するための概念図である。

図 17 は従来の超解像顕微鏡の一例の構成を示す図である。

図 18 は図 17 に示す位相板の構成を示す平面図である。

図 19 は従来の超解像顕微鏡の他の例の構成を示す図である。

好適な実施例の詳細な説明

【0036】

以下、本発明を図面に基づき詳細に説明する。

図 1 は、かかる光空間変調器の概略構成を示す断面図である（以下、液晶型空間変調器とも称する）。この光空間変調器 1 は、対向する 2 枚のガラス基板 2, 3 の内側表面にそれぞれ透明電極（ITO）4, 5 を形成し、これら ITO 4, 5 を有するガラス基板 2, 3 の間に、光導電層としてのアモルファスシリコン（ α -Si）層 6、遮光層 7、誘電体多層膜ミラー 8、および配向膜 9, 10 とスペーサ 11 とで挟まれた平行配向の液晶層 12 を配置した多層構造を有している。なお、ガラス基板 2, 3 の外側表面にはそれぞれ反射防止膜 13, 14 が形成されている。

【0037】

かかる光空間変調器 1 は、ITO 4, 5 間にバイアス電圧を印加した状態で、ガラス基板 2 側から書き込み光を入射させ、ガラス基板 3 側から読み出し光を入射させて、その読み出し光を液晶層 1 2 を経て誘電体多層膜ミラー 8 で反射させ、更に液晶層 1 2 を経てガラス基板 3 から出射させるようにして使用される。

【0038】

このように、ガラス基板 2 側から書き込み光を入射させると、 α -Si 層 6 の抵抗またはインピーダンスが書き込み光の入射強度に応じて低下するので、ITO 4, 5 を介して液晶層 1 2 に印加される電圧は、書き込み光の強度に応じて変化し、それに従って液晶分子の傾き状態、すなわち屈折率に変化して読み出し光の光路長が変化し、読み出し光が変調される。

【0039】

図 1 に示した光空間変調器 1 は、光アドレス型と呼ばれるタイプのもので、各部において書き込み光強度によって読み出し光の位相制御を行うものである。この光空間変調器 1 を用いて読み出し光の位相を 2 次元的に制御するには、例えば図 2 に示すように、光空間変調器 1 と、書き込み用電気信号発生器 2 1、液晶ディスプレイ (LCTV) 2 2、照明光源 2 3、コリメータレンズ 2 4、および結像レンズ 2 5 とにより光空間変調装置 2 6 を構成して、図示しないコンピュータで計算して作成した波面補償データであるコンピュータ合成ホログラム (CGH) を、書き込み用電気信号発生器 2 1 でビデオ信号に変換して LCTV 2 2 に表示し、この LCTV 2 2 を照明光源 2 3 によりコリメータレンズ 2 4 を介して照明して、その表示画像を結像レンズ 2 5 により光空間変調器 1 に書き込み光として結像するようにすればよい (例えば、特開 2000-10058 号公報参照)。

【0040】

このようにすれば、CGH が再生されて、読み出し光が変調を受けるので、読み出し光を 2 次元的に位相制御でき、波面を補正することができる。

【0041】

ここで、コンピュータで作成する CGH は、補正対象波面を実際に検出し、その検出した波面に基づいて作成すればよい。例えば、図 3 に示すように、レーザー光源 3 1 からのレーザー光を空間フィルタ 3 2 を経てコリメータレンズ 3 3 で平行

光にしたのち、対物レンズ 3 4 で試料 3 5 に集光させる光学系の場合には、コリメータレンズ 3 3 からのレーザ光を光空間変調装置 2 6 の光空間変調器で反射させて対物レンズ 3 4 に導くようにすると共に、光空間変調器への入射光路あるいは出射光路（図 3 では入射光路）にハーフミラー 3 6 を配置してレーザ光を分岐し、その分岐されたレーザ光を、例えばシャックハルトマンセンサ等の波面検出器 3 7 で受光して波面を計測する。

【 0 0 4 2 】

波面検出器 3 7 で検出した波面情報はコンピュータ 3 8 に供給し、ここで入力波面情報に基づいて所望の波面を得るための C G H（波面補償データ）を計算して、その計算した C G H を光空間変調装置 2 6 に供給し、ここで図 2 で説明したようにビデオ信号に変換して L C T V に表示して、その表示画像を光空間変調装置 2 6 の光空間変調器に書き込み光として結像させることにより、光空間変調器によるレーザ光の空間変調をフィードバック制御する。

【 0 0 4 3 】

例えば、均一な波面のレーザ光を得る場合において、波面検出器 3 7 で検出された波面が図 4（a）に示す形状のときは、その検出された波面とは逆の形状の図 4（b）に示す波面を光空間変調器にて形成することにより、図 4（c）に示すような均一な出力波面を得るようにする。

【 0 0 4 4 】

なお、波面補償手段は、図 1 に示したような光アドレス型の光空間変調器に限らず、L C T V 等の電気アドレス型光空間変調器を用いたり、光路中に位相板や他の光空間変調器等を配置して、その出力面にホログラム等の手法により波面補正パターンを形成したりすることもできる。また、一つの光空間変調器で、波面補正のパターンとホログラム等のパターンとを重ね合わせたものを位相パターンとして形成することにより、上記と同様に所望の波面を得ることもできる。

【 0 0 4 5 】

上述したような光空間変調器を、超解像顕微鏡の光源光学系に挿入して、光源からのコヒーレント光が試料に到達するまでに発生する波面収差を除去することにより、イレース光として理想的な中空ビームを形成でき、その結果として極限

に近い超解像性を誘起でき、空間分解能を向上することが可能となる。

【0046】

実施例

以下、本発明による顕微鏡の実施例について、図面を参照して詳細に説明する。

【0047】

図5は、本発明の第1実施の形態における顕微鏡の光学系の要部構成を示す図である。本実施の形態の顕微鏡は、ポンプ光およびイレース光とともに空間変調して超解像性を発現させて空間分解能を向上させたレーザ走査型の超解像蛍光顕微鏡を示すものである。以下、ローダミン6Gで染色された生体試料を観察する場合を例にとって説明する。

【0048】

ローダミン6Gは、波長530nm近傍に基底状態(S0)から第1電子励起状態(S1)に励起される吸収帯があり、また、波長600nm近傍に第1電子励起状態(S1)から、よりエネルギー準位の高い電子励起状態に励起される二重共鳴吸収帯域が存在することが確認されている(例えば、E. Sahar and D. Treves: IEEE, J. Quantum Electron., QE-13, 692(1977)参照)。

【0049】

そこで、本実施の形態では、光源として一台のNd:YAGパルスレーザ51を用い、その2倍高調波(532nm)をビームスプリッタ52でコヒーレントな2光束に分岐し、その一方の光束をポンプ光(第1の光)としてビームコンバイナ53およびハーフミラー54で反射させて対物レンズ55により試料56に集光させる。

【0050】

また、ビームスプリッタ52で分岐された他方の光束は、Ba(NO₃)₂結晶からなるラマンシフタ57に入射させ、このラマンシフタ57から出射される波長599nmのコヒーレントな誘導ラマン光をイレース光(第2の光)として用いる。

【0051】

ラマンシフタ57から出射されるイレース光は、ミラー58およびポンプ光と

の照射タイミングを合わせる遅延光学系 5 9 を経て図 1 8 に示した構成の位相板 6 0 に入射させて中空ビームに空間位相変調する。この中空ビーム化されたイレース光は、波面補償手段としての図 2 に示した構成の光空間変調装置 6 1 の空間位相変調器に入射させ、ここで回折されるイレース光をビームサンプラ 6 2 を経てビームコンバイナ 5 3 に入射させることによりポンプ光と同軸上に合成して、ハーフミラー 5 4 および対物レンズ 5 5 を経て試料 5 6 に集光させる。なお、光空間変調装置 6 1 を構成する空間位相変調器は、例えば図 1 に示した複屈折制御型の液晶を有する位相制御型光空間変調器を用いる。

【 0 0 5 2 】

試料 5 6 は、試料移動ステージ 6 3 上に載置し、この試料移動ステージ 6 3 を二次元駆動することで、ポンプ光およびイレース光により試料 5 6 を二次元走査する。

【 0 0 5 3 】

一方、上記のポンプ光およびイレース光の照射により試料 5 6 から発する蛍光は、対物レンズ 5 5 を経た後、ハーフミラー 5 4 を透過させ、さらにハーフミラー 6 4 で反射させて、レンズ 6 5 によりピンホール 6 6 の中央に集光させ、さらにレンズ 6 7 によりフォトマル 6 8 に入射させて検出する。ここで、ピンホール 6 6 は共焦点位置に配置されており、空間フィルタとして機能する。これは、試料 5 6 以外から発する、例えば光学系からの蛍光や散乱光をカットして測定のス／Nを高める作用をなすのと同時に、試料 5 6 内の特定の深さの断層像の信号のみを選び出すオプティカルセクショニングの機能をもつ。

【 0 0 5 4 】

また、ハーフミラー 6 4 を通過した蛍光は、結像レンズ 6 9 を有する CCD カメラ 7 0 により結像して蛍光スポット像を直接観察できるようにし、対物レンズ 5 5 のピント合わせ等に利用する。

【 0 0 5 5 】

本実施の形態では、位相板 6 0 で中空ビーム化されたイレース光の一部をビームサンプラ 6 2 で取り出して、その空間位相分布を波面測定器 7 1 により計測する。

【 0 0 5 6 】

波面測定器 7 1 は、例えば、2 次元 C C D と、その受光面の前方に配置された 2 次元マイクロレンズアレイとを有し、2 次元マイクロレンズアレイにより入射光の瞳面を分割してマイクロレンズ毎に C C D 受光面に集光するようにしたシャックハルトマン型のもの（例えば、仏国：Imagine Optic 社製の H A S O II）を用いる。

【 0 0 5 7 】

この波面測定器 7 1 は、瞳面内で均一の位相分布をもった波面が入射した場合には、マイクロレンズアレイにより分割された各瞳面を通過する光は、全く同じ条件で C C D 受光面に集光し、瞳面内で均一でない位相分布をもった波面が入射した場合には、空間的に位置ずれを生じて集光するのを利用して、その位置ずれを位相のずれに変換して瞳面における位相分布に関するデータを出力するようになっている。

【 0 0 5 8 】

波面測定器 7 1 でのイレース光の空間位相分布の計測結果は、制御コンピュータ 7 2 に供給し、ここで計測結果に基づいてイレース光の波面の乱れを補償するための波面補償データを演算する。この波面補償データは、光空間変調装置 6 1 に供給して、図 2 で説明したように光空間変調器に波面補償データに基づく波面補償パターンを結像させて液晶回折面に屈折率分布を与え、これにより光学系でのイレース光の波面収差を除去するようにイレース光を空間変調する。

【 0 0 5 9 】

なお、光空間変調装置 6 1 によるイレース光の空間変調は、イレース光が理想的な中空ビームになるまで、波面測定器 7 1 での計測結果をフィードバックして制御する。

【 0 0 6 0 】

このように、本実施の形態では、位相板 6 0 で中空ビーム化されたイレース光の空間位相分布を波面測定器 7 1 で測定し、その測定結果に基づいて波面の乱れを補償するように光空間変調装置 6 1 によりイレース光を空間変調するようにしたので、イレース光を完全な中空形状にビーム整形することができる。したがっ

て、極限に近い超解像性を誘起でき、空間分解能を向上することができる。

【0061】

図6は、本発明の第2実施の形態における顕微鏡の光学系の要部構成を示す図である。本実施の形態の顕微鏡は、図5に示した構成において、光空間変調装置61にイレース光を中空ビーム化する機能をも持たせて、位相板60を省略したものである。

【0062】

ここで、仮に、イレース光の波面が完全に均一であれば、イレース光の波長に対して図18に示したような位相分布を光空間変調装置61を構成する光空間変調器の液晶回折面に与えることにより、イレース光を理想的な中空ビームに整形することができる。また、光空間変調器に入射するイレース光の波面が乱れていても、波面測定器71でその波面の乱れを測定して制御コンピュータ72により波面補償データを演算し、その波面補償データを図18の位相分布に重畳して光空間変調装置61に供給すれば、中空ビーム整形と波面補償とを同時に行うことができる。

【0063】

このため、本実施の形態では、光空間変調装置61を構成する光空間変調器の液晶回折面に図18で示したような位相パターンを書き込んで、イレース光を中空ビームとして回折させる。図7は、この際に光空間変調器に結像させる書き込み光（バックライト光）の空間強度分布を示すもので、バックライト光は液晶回折面の中央点を周回するように線形的かつ連続的に光強度分布が増加しており、一番強度が高い光書き込み領域でイレース光波長の入射光に対して 2π の位相差を有している。

【0064】

ところが、単に、光空間変調装置61でイレース光を中空ビーム化しただけでは、試料56に集光されるイレース光のビーム形状は、例えば図8に拡大して示すように、中空化しているものの光強度が不均一で、しかも光軸対称とはならない。これは、Nd:YAGパルスレーザ51から出射されるレーザ光の波面の不均一性、ラマンシフト57で発生する波面収差、その他、光路に存在する光学素

子で発生する位相ずれ等による。

【0065】

そこで、本実施の形態では、波面測定器71でイレース光の波面を測定して制御コンピュータ72により波面補償データを演算し、その波面補償データを中空ビーム化するための位相分布データに重畳して光空間変調装置61に供給することにより、中空ビーム整形と波面補償とを同時に行う。

【0066】

このようにすれば、光空間変調装置61を構成する光空間変調器には、イレース光を中空ビーム化するための図9(a)に示す空間強度分布と、波面測定器71での測定結果に基づいてイレース光の波面を補償するための例えば図9(b)に示す空間強度分布とが重畳された、図9(c)に示すような空間強度分布のバックライト光が書き込まれ、これにより試料56に集光されるイレース光を、図10に拡大して示すように、完全に光軸対称で均一な中空ビームとすることができる。

【0067】

したがって、本実施の形態においても、第1実施の形態と同様に、極限に近い超解像性を誘起でき、空間分解能を向上することができる。しかも、本実施の形態では、位相板を用いることなく、光空間変調装置61によりイレース光の中空ビーム整形と波面補償とを行うようにしたので、第1実施の形態におけるよりも部品点数を削減でき、その分、コストダウンを図ることができる。

【0068】

なお、本発明は上記実施の形態にのみ限定されるものではなく、幾多の変形または変更が可能である。例えば、上記実施の形態では、一つのNd:YAGパルスレーザ51を用いてポンプ光とイレース光とを得るようにしたが、ポンプ光を放射する光源とイレース光を放射する光源とを独立して設けることもできる。

【0069】

また、上記実施の形態ではイレース光を波面補償するように構成したが、ポンプ光の光路に例えば光空間変調器を配置してポンプ光を波面補償するように構成したり、イレース光の光路とポンプ光の光路とに例えば光空間変調器をそれぞれ

配置してイレース光およびポンプ光の双方を波面補償するように構成したりすることもできる。

【 0 0 7 0 】

本実施例では、波面補償の手段として、液晶型空間変調器を紹介したが、この他、2次元的に平面配列させた発電素子アレーによりミラーの空間形状を自由に変化させることによって波面収差を除去することができるデフォーマブルミラー（可変形状鏡）やマイクロミラーアレーを用いることも可能である。

特許請求の範囲

1. 少なくとも基底状態を含む3つの電子状態を有する分子を含む試料に対して、上記分子を基底状態から第1電子励起状態に励起するための第1の光、または上記分子を上記第1電子励起状態から、エネルギー準位のより高い第2電子励起状態に励起するための第2の光を所定のビーム形状に空間位相変調する空間位相変調部 (spatial phase modulator) と、これら第1の光および第2の光を一部分重ね合わせて集光する集光部 (focusing section) と、上記試料からの発光を検出する光検出部 (light detector) と、上記第1の光の光路中および／または上記第2の光の光路中に設けられた波面補償部 (wave front compensator) と、該波面補償部により上記第1の光および／または上記第2の光に生じる波面収差を除去する波面収差除去部 (wave front aberration removal section) とを具えるようにしたことを特徴とする顕微鏡。
2. 上記波面補償部は、光空間変調器を有することを特徴とする請求項1に記載の顕微鏡。
3. 上記光空間変調器は、液晶型空間変調器、デフォーマブルミラー、またはマイクロミラーアレイを含むことを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。
4. 上記光空間変調器により、上記第1の光または第2の光を上記所定のビーム形状に空間位相変調するよう構成したことを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。
5. 上記第1の光および／または上記第2の光の空間位相分布を計測する空間位相分布計測部を設け、該空間位相分布計測部で計測した空間位相分布に基づいて上記光空間変調器により上記第1の光および／または上記第2の光を空間変調するよう構成したことを特徴とする請求項2に記載の顕微鏡。
6. 上記光空間変調器により、上記第1の光または第2の光を上記所定のビーム形状に空間位相変調するよう構成したことを特徴とする請求項5に記載の顕微鏡。
7. 上記空間位相分布計測部で計測した空間位相分布に基づいて波面補償データを生成して、上記光空間変調器による上記第1の光および／または上記第2の光の空間変調をフィードバック制御する制御部を設けたことを特徴とする請求項5に記載の顕微鏡。
8. 上記光空間変調器により、上記第1の光または第2の光を上記所定のビー

ム形状に空間位相変調するよう構成したことを特徴とする請求項 7 に記載の顕微鏡。

9. 少なくとも基底状態を含む 3 つの電子状態を有する分子を含む試料に対して、上記分子を基底状態から第 1 電子励起状態に励起するための第 1 の光、または上記分子を上記第 1 電子励起状態から、エネルギー準位のより高い第 2 電子励起状態に励起するための第 2 の光を所定のビーム形状に空間位相変調する手段と、これら第 1 の光および第 2 の光を一部分重ね合わせて集光する手段と、上記試料からの発光を検出する手段と、上記第 1 の光の光路中および／または上記第 2 の光の光路中に設けられた波面補償手段と、該波面補償手段により上記第 1 の光および／または上記第 2 の光に生じる波面収差を除去する手段とを具えるようにしたことを特徴とする顕微鏡。

要約書

特にイレース光に対して波面の乱れを除去して完全な中空形状をもつビームに整形でき、且つ極限に近い超解像性を誘起して空間分解能を向上できる顕微鏡を提供する。

少なくとも基底状態を含む3つの電子状態を有する分子を含む試料56に対して、上記分子を基底状態から第1電子励起状態に励起するための第1の光、または上記分子を第1電子励起状態から、よりエネルギー準位の高い第2電子励起状態に励起するための第2の光を所定のビーム形状に空間位相変調して、これら第1の光および第2の光を一部分重ね合わせて集光し、試料56からの発光を検出するようにした顕微鏡において、上記第1の光の光路中および／または上記第2の光の光路中に波面補償手段61を設け、該波面補償手段61により上記第1の光および／または上記第2の光に生じる波面収差を除去する。